

Apports de la spectroscopie d'absorption à haute résolution à l'étude taxonomique et écologique de quelques *Trebouxia* (Chlorophycées, Chlorococcales)*

D. SAVOYE¹ et J.C. LECLERC²

RÉSUMÉ. — La dérivation quatrième des spectres d'absorption *in vivo* en lumière visible montre une légère différence, entre les espèces étudiées de chlorococcales et de chlorosarcinales, quant à la position du pic de la chlorophylle b. Il est aussi observé que les holochromes chlorophylliens absorbant dans le rouge sombre sont particulièrement bien développés chez les lichens sciaphiles.

SUMMARY. — The fourth derivation of absorption spectra shows a change in wavelength position of chlorophyll b between the studied strains of chlorococcales and of chlorosarcinales. Several long wavelength chlorophyll a forms are well developed in the algae of lichens living in shaded places.

INTRODUCTION

Une étude de DE NICOLA et DI BENEDETTO (1962) avait montré que les pigments de *Trebouxia decolorans* Ahm. étaient les mêmes que ceux des Chlorococcales. Il n'y a pas eu depuis d'études plus précises de la pigmentation chlorophyllienne du genre *Trebouxia*, lequel a été revu entre temps.

Le genre ancien *Trebouxia* a en effet été divisé en *Pseudotrebouxia*, rattaché à l'ordre des Chlorosarcinales, et en *Trebouxia* qui est maintenu dans l'ordre des Chlorococcales (ARCHIBALD, 1975 AHMADJIAN, 1980; HILDRETH & AHMADJIAN, 1981).

Une étude des bandes d'absorption *in vivo* de la chlorophylle en lumière rouge, est apparue utile pour mettre en évidence d'autres différences entre les espèces de l'ancien genre *Trebouxia*.

Alors qu'on n'extrait des végétaux, par solvants, qu'une chlorophylle a, les bandes d'absorption *in vivo* de cette dernière sont pourtant nombreuses (BROWN, 1972), on les appelle : formes de chlorophylle a ou holochromes chlorophylliens. L'origine de la variété de ces holochromes vient en grande

* Accepté le 15 mai 1982.

1. Laboratoire de Cryptogamie, Université Paris VI, 9, Quai Saint-Bernard, 75005 Paris.
2. Laboratoire de Structure et Métabolisme des Plantes, Bat. 430, 91405 Orsay.

partie de l'influence réciproque qu'exercent les unes sur les autres des molécules de pigments proches mais non liées entre elles (KASHA, 1963). Or on sait (THORNER, 1975) que les molécules de chlorophylle *in vivo* sont portées par une matrice protéique (complexes chlorophylle-protéines) et sont proches les unes des autres dans ces complexes (FENNA et MATTHEWS, 1977). L'abondance et la nature chimique des lipides des thylakoïdes peuvent aussi avoir une influence structurale et donc une influence sur les spectres d'absorption de la chlorophylle.

Comme l'identité des protéines et la composition lipidique des thylakoïdes sont déterminées génétiquement, la spectroscopie d'absorption en lumière rouge apparaît comme une méthode d'analyse taxonomique (voir aussi LECLERC et COUTÉ, 1976).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Récolte des lichens

Xanthoria parietina (L.) Beltr., dont l'algue est un *Pseudotreboxia* sp., est récolté à Orsay sur un mur calcaire orienté vers le sud. *Evernia prunastri* (L.) Ach., dont l'algue est un *Pseudotreboxia* sp., est recueilli en Normandie, sur les troncs de jeunes chênes à la lisière d'un bois. *Cladonia flabelliformis* (Fr.) Wainio, dont l'algue est un *Treboxia* sp. est récolté à Orsay sur un mur calcaire orienté au nord.

Isolement des algues

Cinq grammes de thalles sans sorédies sont broyés dans 30 ml de tampon de Sorensen 0,15 M pH 7,2. La suspension obtenue est centrifugée 30 s à 60 g. Le surnageant est repris et centrifugé 5 mn à 400 g, le culot est ensuite remis en suspension dans du tampon neuf. La dernière centrifugation et la remise en suspension sont répétées 3 fois.

Spectres d'absorption

Avec *Pseudotreboxia* sp. isolé de *X. parietina*, des fragments de thylakoïdes ont pu être obtenus à partir de cellules cassées à la presse de French (2 fois sous 1000 kg cm^{-2} dans du tampon Sorensen 0,15 M pH 7,2). Après passage à la presse, une centrifugation de 10 mn à 5000 g permet d'éliminer un culot de débris, les thylakoïdes sont en suspension dans le surnageant. Cette suspension est directement utilisable pour la spectrophotométrie. L'algue *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorococcale, Strain 211/8b de Göttingen) cultivée au laboratoire se traite de la même manière et sert de point de comparaison.

Pour *Pseudotreboxia* sp., isolé de *E. prunastri*, et *Treboxia* sp., dont les cellules sont très résistantes, il a fallu se contenter de spectres *in situ* de suspensions de cellules entières. Les spectres à 20°C sont alors effectués avec des cellules en suspension dans du tampon et du dextran 20% V/V, cependant que ceux à -196°C sont étudiés sur un mince film humide de cellules déposé sur une lamelle de verre et congelé dans l'appareil décrit par HOARAU et LECLERC (1973).

Tous les spectres sont réalisés, à $\pm 1.10^{-4}$ de précision en densité optique, avec l'appareil et la méthode décrits dans LECLERC et coll. (1975).

Cinq spectres d'absorption sont utilisés pour le calcul de chaque dérivée quatrième qui est effectué à des intervalles de 0,37 nm avec des groupes de 120 densités optiques (LECLERC *et al.* 1975).

Les principales bandes d'absorption qui sont constituantes d'un spectre d'absorption complexe donnent chacune un pic de dérivée quatrième correspondant à $\pm 0,5$ nm à la position exacte de la bande considérée, laquelle est souvent noyée dans l'ensemble du spectre d'absorption.

Les travaux sur cellules entières ou sur thylakoïdes isolés ont chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Si les spectres de cellules entières ne peuvent, étant entachés d'un effet crible, être utilisés pour une quantification précise des bandes d'absorption, en revanche les spectres de thylakoïdes, dont la qualité optique est bien meilleure, peuvent être appauvris par suite de la disparition de bandes d'absorption lors de l'isolement des membranes chloroplastiques.

RÉSULTATS

a) Les principales bandes d'absorption de la chlorophylle

Les analyses de dérivée quatrième indiquent chez les espèces étudiées une assez grande similitude de position des bandes d'absorption à 20°C et à -196°C (Fig. 1) sauf pour la bande principale d'absorption de la chlorophylle a, de même que chez beaucoup d'autres algues (LECLERC *et al.* 1979). Il est donc préférable finalement d'étudier les spectres à 20°C et de n'utiliser les spectres au froid que pour l'analyse de quelques bandes secondaires, au-delà de 700 nm en particulier, ces dernières étant souvent peu visibles sur les dérivées à 20°C. L'appareillage utilisé permet de définir la position des bandes à $\pm 0,5$ nm.

Il apparaît (Tableau 1) que les positions de la bande principale d'absorption

Espèce	λ_a	λ_b	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	681	648	9	0-005	0,1
<i>Pseudotrebouxia</i> sp. (isolé de <i>Xanthoria parietina</i>)	683	650,5	11	0	0,15
<i>Pseudotrebouxia</i> sp. (isolé d' <i>Evernia prunastri</i>)	683,5	650,5	14,5	0	0,2
<i>Trebouxia</i> sp. (isolé de <i>Cladonia flabelliformis</i>)	683	649	21,5	0,5	0,8

Tab. 1. — Longueur d'onde d'absorption et importance relative de quelques formes de chlorophylle.

λ_a : position en nm de la bande principale de chlorophylle a à 20°C.

λ_b : position de la bande principale de chlorophylle b à 20°C.

R₁ : rapport (en %) de la densité optique à 20°C à 700 nm sur celle à 676-679 nm.

R₂ : rapport de la hauteur du pic de dérivée quatrième à 692-693 nm sur celle du pic à 681-684 nm.

R₃ : rapport de la hauteur du pic de dérivée quatrième à 696-697 nm sur celle du pic à 681-684 nm.

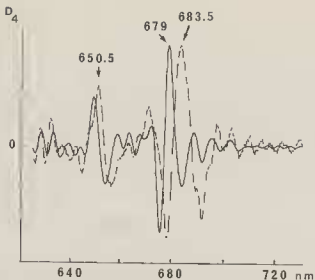


Fig. 1. — Dérivées quatrièmes des spectres d'absorption à 20°C et -196°C de cellules de *Pseudotrebouxia* sp. isolé d'*Evernia prunastri*. — Chaque pic correspond à une bande d'absorption, c'est-à-dire à une forme de chlorophylle. Le tracé plein représente la dérivée à basse température, le tracé en tirets celle à température ordinaire.

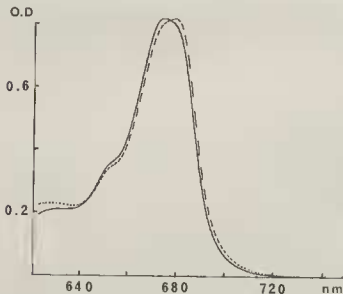


Fig. 2. — Spectres d'absorption à 20°C. — Le tracé plein représente le spectre de *Trebouxia* sp. isolé de *Cladonia flabelliformis* qui est l'algue d'un lichen vivant dans des endroits ombragés. Le tracé en tirets représente le spectre de *Pseudotrebouxia* sp. qui fait partie d'un lichen vivant en lisière de forêt.

de la chlorophylle a, ainsi que celles de la bande de chlorophylle b, sont nettement différentes selon les genres et les ordres. Les deux Chlorosarcinales ont la bande de chlorophylle b à 650,5 nm cependant qu'elle n'est qu'à 648 et 649 nm chez les deux Chlorococcales étudiées. La bande principale de chlorophylle a est à 683 nm chez les algues de lichen utilisées mais à 681 nm chez *Chlorella*. Les deux *Pseudotreboxia* ne se distinguent donc pas par les critères spectraux basés sur les principales bandes de chlorophylle.

b) Les bandes d'absorption dans le rouge sombre

Parmi les lichens étudiés, ceux vivant en faible lumière ont plus d'absorption dans le rouge sombre (Fig. 2). On voit nettement que l'absorption à 700 nm (Tableau 1, colonne R₁) est croissante dans l'ordre suivant : *Chlorella* < *Pseudotreboxia* sp. < *Pseudotreboxia* sp. < *Treboxia* sp. L'ordre est le même (colonne R₃) pour l'importance du pic d'absorption à 696-697 nm tel qu'il est décelé par la dérivation quatrième. Le pic 692-693 nm n'est pratiquement vu que chez *Treboxia* sp.

Il se trouve que les deux algues qui ont le moins de chlorophylle absorbant dans le rouge sombre, sont celles qui ont poussé dans les milieux les mieux éclairés : sous 30 W.m⁻², 12 h par jour pour *Chlorella* et sur un mur exposé au sud pour *Pseudotreboxia* sp. isolé du *Xanthoria* mais avec toutefois ici la protection par le champignon. Le cas intermédiaire est *Pseudotreboxia* sp. isolé d'*Evernia prunastri* qui vit dans un lichen poussant sous un éclairage naturel moyen; cependant que *Treboxia* sp., très riche en chlorophylle abondant vers 700 nm, et possédant même une bande d'absorption vers 735 nm, vit dans un lichen qui pousse sur un mur ombragé.

Des différences qualitatives existent aussi entre les espèces, ainsi *Treboxia* sp. possède une bande à 692 nm qui n'est que difficilement décelable chez *Chlorella* (Tableau 1).

c) La fragilité des bandes d'absorption chlorophylliennes de *Pseudotreboxia* sp. (isolé de *Xanthoria parietina*)

Avec cette espèce dont les cellules peuvent aisément être cassées soit par la presse de French, soit par une succession de congélations et décongélations, on observe de forts changements du spectre d'absorption après traitement. Ainsi (Fig. 3) l'ensemble du spectre d'absorption dans le rouge est nettement décalé vers les courtes longueurs d'ondes. Ce phénomène s'analyse mieux en dérivée quatrième : on observe alors que la hauteur du pic de dérivée à 671 nm, qui n'est que de 31% de celle du pic à 683 nm dans les cellules entières, passe à 37% dans les cellules cassées. Le pic à 663 nm augmente lui de plusieurs fois; il en est vraisemblablement de même, quoique les résultats soient moins visibles, pour le pic à 658 nm. On remarquera en revanche que le pic de la chlorophylle b ne change pas sensiblement.

DISCUSSION

On doit examiner séparément le cas de la chlorophylle b et des holochromes de chlorophylle a, généralement considérés comme des pigments de l'antenne

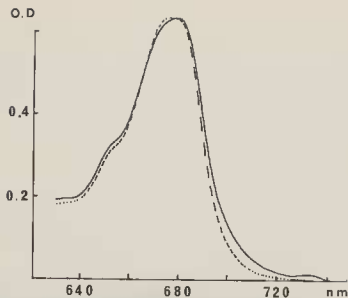


Fig. 3. — Spectres d'absorption de *Pseudotrebouxia* sp. isolé de *Xanthoria parietina* à 20°C. — Tracé plein : thylakoïdes isolés de cellules cassées à la presse de French. Tirets : cellules intactes.

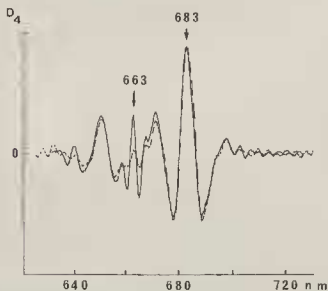


Fig. 4. — Dérivées quatrièmes de spectres d'absorption de *Pseudotrebouxia* sp. isolé de *Xanthoria parietina* à 20°C. — Tracé plein : thylakoïdes de cellules cassées. Tirets : cellules intactes.

du photosystème II de la photosynthèse, et le cas des formes de chlorophylle a absorbant de 690 à 740 nm qui sont généralement considérées comme faisant partie du photosystème I.

Les 4 espèces étudiées ont, outre la bande de chlorophylle b, 2 bandes de chlorophylle a vers 670 nm et une grande bande de chlorophylle a vers 681-683 nm. Si les bandes vers 670 nm sont constantes, les autres présentent des différences de positions significatives permettant de distinguer les deux ordres étudiés (position de la chlorophylle b) ou bien les deux genres de Chlorococcales (bande de chlorophylle a à 681 ou 683 nm).

S'il n'est bien sûr pas possible de généraliser ces données à l'ensemble des Chlorococcales et des Chlorosarcinales, les quelques espèces étudiées permettent de penser que la position en longueur d'onde de formes de chlorophylle peut être envisagée comme caractère phénotypique utile à la distinction des espèces tout comme d'autres caractères d'ordre biochimique.

Dans le cas des formes de chlorophylle absorbant de 690 à 740 nm, les caractères écologiques se mêlent aux caractères taxonomiques.

Il est bien connu (BROWN, 1963; LECLERC *et al.* 1980) que beaucoup d'espèces d'algues vivant en lumière faible sont riches en chlorophylle absorbant dans le rouge sombre, toutefois certaines de ces espèces vont s'appauvrir en ces chlorophylles si elles sont cultivées en lumière plus forte. Ainsi les importantes formes de chlorophylle caractéristiques de *Trebouxia* sp., et absorbant à 692 et 697 nm, disparaîtraient-elles peut-être, ou bien seraient suffisamment atténuées, si cette espèce était cultivée au laboratoire en lumière forte : elle ne se distinguerait plus alors de *Chlorella* de ce point de vue.

Il apparaît donc prudent de réserver provisoirement l'usage des holochromes chlorophylliens de grande longueur d'onde à la caractérisation des espèces d'algues qui ne poussent qu'en lumière atténuée.

Le cas particulier du pigment absorbant à 734 nm de *Trebouxia* sp. apparaît intéressant à un autre titre : GILES (1970) a en effet montré que la lumière rouge claire favorisait la production d'aplanospores de cette espèce cependant que la lumière rouge sombre l'inhibait. Il se pourrait donc que le pigment que nous détectons à 734 nm soit une forme d'un pigment proche physiologiquement du phytochrome des plantes supérieures.

Un dernier point, dont l'intérêt est en partie technique, est que d'une part certaines algues de lichens sont résistantes au cassage des cellules, ce qui limite la qualité spectroscopique des préparations, et que d'autre part la rupture des cellules de *Pseudotrebouxia* sp. isolé de *X. parietina* s'accompagne d'une dénaturation assez sérieuse de l'absorption chlorophyllienne. Cette dénaturation peut s'expliquer soit par l'action d'une chlorophyllase (TERPSTRA et GOEDHEER, 1975) ou bien par celle des protéases, puisque les chlorophylles sont portées par une matrice protéique. La dénaturation est très peu marquée chez *Chlorella* dont les cellules peuvent aussi être brisées. Ainsi chez certaines espèces, la fragilité des formes d'absorption chlorophyllienne, qui dépend peut-être en grande partie il est vrai de la présence de certaines enzymes, peut donc constituer aussi un caractère spécifique.

La spectroscopie d'absorption chlorophyllienne apparaît donc de plusieurs points de vue utile à l'analyse taxonomique, écologique et physiologique des algues, indépendamment de la physiologie de la photosynthèse proprement dite.

BIBLIOGRAPHIE

- AHMADJIAN, V., 1980 — Separation and artificial synthesis of lichens. In Cellular Interactions in Symbiosis and Parasitism. Ohio State University Press.
- ARCHIBALD, P.A., 1975 — *Trebouxia* de Puymaly (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* gen. nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). *Phycologia* 16 : 295-300.
- BROWN, J.S., 1963 — The separation of the forms of chlorophyll a and the absorption changes in *Euglena* during aging. *Biochim. Biophys. Acta* 75 : 299-305.
- BROWN, J.S., 1972 — Forms of chlorophyll *in vivo*. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 23 : 73-86.
- DE NICOLA, M.G., DI BENEDETTO, G., 1962 — Ricerche preliminari sui pigmenti dell' phycobionte lichenico *Trebouxia decolorans* Ahs. III. Chlorophylles e Carotenoides. *Boll. Ist. Botan. Univ. Catania* 3 : 22-33.
- GILES, K.L., 1970 — The phytochrome system, phenolic compounds, and aplanospore formation in a lichenized strain of *Trebouxia*. *Can. J. Bot.* 48 : 1343-1346.
- FENNA, R.E. and MATTHEWS, B.W., 1977 — Structure of a Bacteriochlorophyll a protein from *Prosthecochloris aestuarii*. In «Chlorophyll-Proteins, reaction centers and Photosynthetic membranes». Brookhaven Symp. Biol. 28, 170-182.
- HILDRETH, K.C. and AHMADJIAN, V., 1981 — A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. *Lichenologist* 13, 65-86.
- HOARAU, J. and LECLERC, J.C., 1973 — Low temperature absorption spectrum studies : light-induced pigment changes in *Porphyridium* cultures. *Photochem. Photobiol.* 17 : 403-412.
- KASHA, M., 1963 — Energy transfer and the molecular exciton. Model for Molecular Aggregates. *Radiation Res.* 20 : 55-71.
- LECLERC, J.C., HOARAU, J. and GUERIN-DUMARTRAIT, E., 1975 — An analysis of *Porphyridium* absorption bands with a digital spectrophotometer. *Photochem. Photobiol.* 22 : 41-48.
- LECLERC, J.C. and COUTÉ, A., 1976 — Révision de la position systématique de l'algue parasite *Phyllosiphon arisari* Kühn d'après l'analyse spectrophotométrique de ses chlorophylles. *C. R. Acad. Sc. Paris* 282, Série D : 2067-2070.
- LECLERC, J.C., HOARAU, J. and REMY, R., 1979 — Analysis of absorption spectra changes induced by temperature lowering on phycobilisomes, thylakoids and chlorophyll-protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 547 : 398-409.
- LECLERC, J.C., COUTÉ, A. and HOARAU, J., 1980 — Pigments and photosynthetic activity adaptations in some algae living in low light places. Proceedings of the 5th International Congress on Photosynthesis (in press).
- TERPSTRA, W. and GOEDHEER, J.C., 1975 — Chlorophyllase and lamellar structure in *Phaeodactylum tricorutum*. I : chlorophyll → chlorophyllide conversion within the lamellae. *Z. Pflanzenphysiol.* 75 : 118-130.
- THORNER, J.P., 1975 — Chlorophyll-proteins, light-harvesting and reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26 : 127-158.